



日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

09/740,903  
#3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年12月22日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第365554号

願人

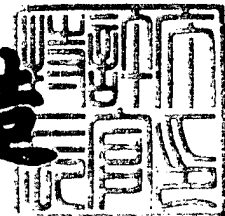
Applicant(s):

株式会社ニチレイ

2001年 1月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3112175

【書類名】 特許願

【整理番号】 6241

【提出日】 平成11年12月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都新宿区中落合 1 - 7 - 3 - 4 0 2

    【氏名】 大林 弘一

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都東村山市多摩湖町 3 - 7 - 1 - 2 0 4

    【氏名】 北野 由里子

【特許出願人】

    【識別番号】 000134970

    【住所又は居所】 東京都中央区築地六丁目 1 9 番 2 0 号

    【氏名又は名称】 株式会社ニチレイ

【代理人】

    【識別番号】 100075775

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 戸田 親男

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 067287

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素－タンパク質複合体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 担体に 2 個以上の酵素が結合し、その酵素の少なくとも 1 個以上に他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合したこと、を特徴とする酵素－タンパク質複合体。

【請求項 2】 担体に 2 個以上の酵素が結合し、その酵素の少なくとも 1 個以上に他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合し、かつ、この担体上にも直接他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合したこと、特徴とする酵素－タンパク質複合体。

【請求項 3】 担体が 5, 0 0 0 ～ 5 0 0, 0 0 0、好ましくは 1 0, 0 0 0 ～ 3 0 0, 0 0 0 の分子量を有するものであること、を特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の複合体。

【請求項 4】 担体が 2 個以上のアミノ基を有することを、特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 5】 担体が、塩基性アミノ基を 2 個以上有するペプチドポリマー、あるいは、アミノ基、アルデヒド基、ビニル基の少なくともひとつを導入した多糖類であること、を特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 6】 担体がポリリジンであること、を特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 7】 酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼから選ばれる少なくとも 1 つであること、を特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 8】 他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が抗体又は抗体断片であること、を特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 9】 抗体がポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体であること、を特徴とする請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 1 0】 抗体断片が  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fabc'$  から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 1 1】 他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質がアビジン又はストレプトアビジンであること、を特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 1 2】 請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の複合体を含有すること、を特徴とする免疫測定用キット。

【請求項 1 3】 免疫測定が免疫組織染色又は酵素免疫測定であること、を特徴とする請求項 1 2 に記載の免疫測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、担体を介して共有結合した酵素上に、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質を結合させた酵素-タンパク質複合体に関するもので、その複合体は免疫組織化学、エンザイムイムノアッセイなどの免疫測定に利用される。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

近年の免疫化学の進歩により、抗原抗体反応を用いて微量の物質を感度良く検出する免疫測定が広く用いられるようになった。現在、免疫測定の中で一般的なものは免疫組織染色及び酵素免疫測定の 2 分野である。

【0 0 0 3】

免疫組織染色とは、組織上の特定の抗原を、その抗原を特異的に認識する抗体によって検出する手法である。通常は、組織を固定後パラフィン包埋したブロックから薄切した切片上に特定の抗原を認識する抗体を反応させ、反応した抗体の有無から抗原の存在を判断する。最初に抗原と反応させる抗体を通常、第一抗体と呼ぶ。第一抗体に、視覚または機器により検出し得るシグナルを発する物質を結合させておけば、そのシグナルの強度から第一抗体の量がわかり、それは即ち切片上の抗原の量に対応する。この目的を達成するためのシグナルを発する物質として蛍光物質、酵素などが挙げられる。免疫組織染色が開発された当初はシグ

ナルを発する物質として蛍光物質が用いられていた。その際には蛍光は検出するための蛍光顕微鏡が必要であった。

#### 【0004】

その後、N a k a n e らにより酵素抗体法が確立され、光学顕微鏡での染色像の解析が可能となった。現在では、シグナルを発する物質として酵素を用いるのが一般的である。免疫組織染色を行う際、第一抗体に酵素を結合させておけば、その酵素の発色性の基質を加えることにより酵素活性に対応した発色が得られ、それは抗体の量に対応、即ち組織上に存在する抗原の量に対応する。しかし、この方法では通常十分な感度が得られない。

#### 【0005】

現在最も広く用いられている方法は、ストレプトアビジンビオチン法（S A B 法）と呼ばれ、抗原に結合した第一抗体のシグナルを増幅させて検出する手法である。この方法ではまず、組織切片上の特定の物質を認識する第一抗体を反応させる。次に第一抗体に結合する第二抗体を反応させる。第二抗体は通常第一抗体を認識して結合するポリクローナル抗体で、第一抗体に複数の第二抗体が結合する。第二抗体には予め複数のビオチンを結合させてある。この第一抗体ービオチン結合第二抗体複合体に酵素結合ストレプトアビジン（酵素試薬）を反応させる。ストレプトアビジンはビオチンと強固に結合することが知られている。したがって、第一抗体ービオチン結合第二抗体ー酵素結合ストレプトアビジンの複合体が形成される。この方法によると第一抗体に複数のビオチン結合第二抗体が結合、さらにビオチン結合第二抗体に複数の酵素結合ストレプトアビジンが結合するため、結果的に第一抗体に結合する酵素量は大幅に増加する。その結果、高い感度で組織切片上の抗原を検出できる。

#### 【0006】

このように S A B 法は抗原に結合した第一抗体に結果的に多数の酵素が結合し、より強いシグナルを得ることができる優れた方法である。しかしながら、その操作面に視点を向けると第一抗体の反応、第二抗体の反応、酵素試薬の反応という 3 段階の操作を行う必要がある。このように S A B 法は、工程が多く、正確性ととともに迅速性、簡便性が要求される医療等の現場ではまだ十分なものとはいえ

ず、改良がなされている。

【0007】

もう1つの一般的な免疫測定の手法としては、エンザイムイムノアッセイ（EIA）が知られている。EIAの代表的な原理及び操作は次のとおりである。まず、ポリスチレンビーズあるいはマイクロプレート等の担体に、測定したい物質を認識する抗体を固相化する。次いで、アルブミン等のタンパク質によって担体をブロッキングした後、次に測定目的の物質（抗原）が含まれる溶液（検体）を加える。その後、抗原を認識する抗体に酵素を結合させたもの（酵素標識抗体）を加える。即ち2つの抗体で抗原を挟み込む。次に余分な酵素標識抗体を洗い去った後、酵素の発色性の基質を加え発色させる。抗原の量は酵素活性に依存するため、あらかじめ既知の濃度の抗原を試料とした際の発色と比較することにより、検体中の抗原の濃度がわかる。エンザイムイムノアッセイにおいて感度に関わる要素はいくつかあるが、酵素標識抗体の質は重要な要素の一つである。即ち酵素標識抗体に酵素が多数結合していれば、強いシグナルが得られ、高い感度で抗原を定量できると考えられる。

【0008】

このように免疫測定において、酵素標識抗体の質は大変重要であり、測定系の感度、あるいは操作の段階数に多大な影響を及ぼす。これまでに高感度の酵素標識抗体を得るために、下記に例示するように、数々の試みがなされてきた。その多くは担体に多数の酵素と抗体を結合させるものである。

【0009】

特開昭63-503138では、薬物、トキシン、キレーター、ホウ素付加体などの検出し得る標識の誘導体が結合した担体に抗体を結合させた。担体としてはアミノデキストランを使用し、まずアミノデキストランにメソトキセートなどの薬物を結合させる。その後、抗体の糖鎖を過よう素酸ナトリウムで酸化させて生じるアルデヒド基とアミノデキストランのアミノ基を反応させた後、水素化シアノホウ素ナトリウムにより還元し共有結合させ、薬物、抗体、アミノデキストランの複合体を作製した。

【0010】

特開平 3 - 1 5 8 7 5 8 ではデキストランを過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、生じたアルデヒド基とアルカリ性フォスファターゼ及び抗体のアミノ基を反応させた後、水素化ホウ素ナトリウムにより還元し、酵素、抗体、デキストランの複合体を作製した。

【 0 0 1 1 】

また、特表平 6 - 5 0 9 1 6 7 ではデキストランなどのポリマーにジビニルスルフォンを反応させビニル基を導入後、酵素及び抗体を反応させることにより酵素、抗体、デキストランの複合体を作製した。

【 0 0 1 2 】

これらの方法により調製された複合体はいずれもポリマーに直接、2 種の物質が結合することにより形成される複合体であった。これらの方法で調製された複合体はいずれも、担体を介さずに直接 2 つの物質を結合させた場合と比較してその性能は向上したと言う。しかしながら、これらの方法には次のような欠点がある。即ち、一つの担体に 2 種の物質を結合させる場合、この担体に結合しうる物質の量には限りがあるため、一方の物質を多く結合させれば他方の物質の結合量は少なくなる点である。この問題点を解決できればさらに性能の良い複合体となる可能性がある。

【 0 0 1 3 】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、上記欠点を解消した高品質な酵素－タンパク質複合体を新たに提供することである。

【 0 0 1 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、高品質な酵素－タンパク質結合体を得るために酵素－タンパク質複合体の製造方法について検討を行った結果、担体に酵素を結合させ、さらに酵素上にタンパク質を結合させることでその目的が達成されることを見出し、さらに研究を行い、ついに本発明の完成に至ったものである。

【 0 0 1 5 】

即ち、本発明は、担体に 2 個以上の酵素が結合し、その酵素の少なくとも 1 個

以上に他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合した酵素-タンパク質複合体に関するものである。さらには、このようにして得た酵素-タンパク質複合体の担体上にも、直接他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合した酵素-タンパク質複合体にも関するものである。したがって本発明に係る酵素-タンパク質複合体においては、酵素と他の物質に特異的に結合性を示すタンパク質が結合した酵素が担体に多数結合しているか、又は、酵素と他の物質に特異的に結合性を示すタンパク質が結合した酵素及び担体に直接結合した他の物質に特異的に結合性を示すタンパク質が、担体に多数結合していることとなる。

以下に本発明を詳細に説明する。

#### 【0016】

本発明は、当初免疫組織化学、エンザイムイムノアッセイの分野において使用できる酵素-タンパク質複合体について検討する過程でなされたものであるが、他の分野に適用することに何ら制限はない。

#### 【0017】

本発明でいう担体とは、タンパク質、多糖類などで特に制限はない。しかし、免疫測定之感度を上げるには多数の酵素を担体に結合させることが望ましい。従って、ある程度の大きさの分子量であることと、酵素を結合させるための反応性官能基が存在することあるいは反応性官能基を導入できることが必要である。そのような目的を達成する担体の例としては、ペプチドポリマー及び／又は多糖類が挙げられ、さらにはそれらの分子量が5,000～500,000、さらに好ましくは10,000～300,000の分子量のものが適している。ただし、上記の分子量の範囲は一応の目安を示したものであって、液中で沈澱や沈降を生じないものであれば上記範囲よりも大きな分子量のものであっても使用可能であり、また、本発明の目的が達成されるのであれば上記範囲よりも小さい分子量のものでも使用可能である。

#### 【0018】

本発明においては、例えば、結合性を有する2個以上の多数のアミノ基を含有するペプチドが担体として適宜使用される。その1例としては、リジン、アルギニン、オルニチン、グルタミン、各種塩基性アミノ酸等 $\alpha$ -アミノ基、 $\epsilon$ -アミ



ノ基その他を有するアミノ基を有するペプチドが例示される。更にその具体例としては、 $\epsilon$ -アミノ基を有するリジンのポリマーであるポリリジンのほか、リジンを有するとともに他のアミノ酸も有する各種ペプチドが挙げられる。そして後者のペプチドポリマーの例として、リジンとグリシンのランダムコポリマー、リジンとセリンのランダムコポリマー、リジンとグルタミン酸のランダムコポリマーなどが挙げられ、各種分子量のものが市販されている。

## 【0019】

一方、アルデヒド基、アミノ基あるいはその他の活性基を導入した多糖類も、本発明における担体として使用することができる。多糖類としては、デキストラン、アガロース、デキストリン、可溶性澱粉等が例示される。アルデヒド基を有する多糖類は、多糖類に過よう素酸ナトリウムを反応させることにより容易に調製できる。また、アミノ基も公知の方法により多糖類に導入できる。例えばアミノ基を有するデキストランは、デキストランを過よう素酸ナトリウムで処理しアルデヒド基を生成させた後、ジアミンと反応させ水素化ホウ素ナトリウムにて還元することにより調製できる。また、多糖類への活性基の導入も公知の方法で行える。例えば、デキストランにジビニルスルホンと反応させることにより、ビニル基を有するデキストランが得られる。

## 【0020】

本発明において使用する酵素としては、2個以上のアミノ基を有するものであればすべての酵素が使用可能であって、免疫測定において一般的に使用される酵素が適宜使用される。その例として限定はしないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられる。

## 【0021】

本発明でいう他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質とは、特定の抗原と結合する抗体、特定のリガンドと結合するレセプター等である。例えば、特定の抗原と結合するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、ビオチンと特異的に結合するアビジン及びストレプトアビジン、抗体と特異的に結合するプロテインA及びプロテインG、糖鎖と特異的に結合するレクチン、ヒアルロン酸と特異

的に結合するヒアルロン酸結合タンパク質等である。また、これらの他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質の分子中に存在する、特定の物質に特異的に結合するタンパク質断片をも含有する。例えば、抗体の断片である $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fabc'$ などである。

## 【 0 0 2 2 】

本発明においては、まず担体と酵素の複合体を調製する。その方法は、例えば担体のアミノ基をチオール化し、アミノ基をマレイミド化した酵素と混合する。チオール基とマレイミド基は速やかに反応し共有結合するので、酵素が結合した担体を得られる。

## 【 0 0 2 3 】

担体のアミノ基にチオール基を導入するには、S-アセチルメルチルカプト無水コハク酸 (S-acetylmercaptosuccinic anhydride)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP)、S-アセチルチオグリコリックアシドN-ヒドロキシスクシンイミド (S-acetylthioglycolic acid N-hydroxysuccinimide, SATA)などを用いる方法が知られている。これらの試薬はアミノ基と反応し、ブロックされたチオール基が導入される。その後、S-acetylmercaptosuccinic anhydride、SATAを用いた場合はHydroxylamine、SPDPを用いた場合はジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT)で処理することによりチオール基をブロックしている保護基を除去し、チオール基を生成する。

## 【 0 0 2 4 】

アミノ基にマレイミド基を導入するには、1分子中にマレイミド基とスクシンイミドエステル基を有する化合物を使用する。例えば、一端にマレイミド基を、他端にN-ヒドロキシスクシンイミド基を有する二価の架橋剤を用いればよい。例えば、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スクシンイミド (N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS)、N-(4-マレイミドブチリロキシ)スクシンイミド (N-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide (GMB S) などである。

## 【 0 0 2 5 】

1 分子中にマレイミド基とスクシンイミド基を併有する化合物としては、上記したEMCS、GMB Sのほか、次のものが非限定的に例示される：N-スクシンイミジル-N-マレイミドアセテート (N-Succinimidyl-N-maleimidoacetate)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミド) ブチレート (N-Succinimidyl-4-(N-maleimido) butyrate)、N-スクシミジル-6-(マレイミド) ヘキサノエート (N-Succinimidyl-6-(N-maleimido) hexanoate、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (N-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate)、N-スクシンイミジル-m-(N-マレイミド) ベンゾエート (N-succinimidyl-m-(N-maleimido) benzoate)、N-スクシミジル-p-(N-マレイミドフェニル)-4-ブチレート (N-Succinimidyl-p-(N-maleimidophenyl)-4-butyrate)、N-スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (N-Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate)、N-スクシンイミジル-m-(N-マレイミド) ベンゾエート (N-Succinimidyl-m-(N-maleimido) benzoate)、N-スルホスクシンイミジル-p-(N-マレイミドフェニル)-4-ブチレート (N-Sulfosuccinimidyl-p-(N-maleimidophenyl)-4-butyrate) など。

#### 【0026】

本発明においては担体にさらに別の物質を結合させる必要はないため、可能な限り酵素が多数結合した担体-酵素複合体を調製することが望ましい。その目的を達成する手法の一例を次に示す。前記の酵素-担体複合体にマレイミド化試薬を大過剰加えて反応させ、複合体上に残存したアミノ基のほとんどすべてにマレイミド基を導入する。そして、酵素に少なくとも1個以上のアミノ基が残存する条件で、酵素をチオール化する。これは後にこの酵素上に残存するアミノ基を利用して、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質を結合させるためである。このチオール化した酵素と、マレイミド基を導入した酵素-担体複合体を反応させる。

#### 【0027】

その後、残存したマレイミド基をチオール基を有する物質でブロックする。ブ

ロックに用いられるチオール基を有する物質の例としてはメルカプトエタノール、システアミン塩酸塩、システインなどが挙げられる。メルカプトエタノールでブロックした場合には、酵素-担体複合体にはチオール化した酵素上にのみアミノ基が存在する。システアミン塩酸塩、システインでブロックした場合、酵素-担体複合体にはチオール化した酵素上にアミノ基が存在し、さらに残存したマレイミド基をブロックした試薬に存在するアミノ基が加わる。

## 【 0 0 2 8 】

上記酵素-担体複合体に他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質を結合させるには、酵素-担体複合体を調製した際と同様にチオール基とマレイミド基の反応を利用すればよい。例えば、酵素-担体複合体に存在するアミノ基に上述したマレイミド基を導入する試薬を反応させる。次に他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質に同じく上述したチオール基を導入する試薬を反応させる。この両者を混合すれば酵素-他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質-担体の複合体が完成する。他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質に、他の物質との結合に関与しないS-S結合が存在するなら、チオール化する代わりにシステアミン塩酸塩、DTTなどで還元することによりチオール基を生成させることも可能である。

## 【 0 0 2 9 】

また、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が糖鎖を有するならばそれを利用してよい。例えば、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質の糖鎖を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し生成したアルデヒド基と、酵素-担体複合体上のアミノ基を反応させた後、還元することにより両者を結合させることも可能である。

## 【 0 0 3 0 】

完成した複合体は、酵素-担体複合体の調製時の最後に担体上に残存するマレイミド基をメルカプトエタノールでブロックした場合は、酵素上にのみ他の物質に特異的に結合性を示すタンパク質が結合した複合体となる。また、酵素-担体複合体の調製時の最後に担体上に残存するマレイミド基をシステアミン塩酸塩、あるいはシステインでブロックした場合は、酵素上及び担体上のいずれにも他の

物質に特異的な結合性を示すタンパク質が結合した複合体が形成される。

【 0 0 3 1 】

本発明の実施態様の一つとして、担体としてポリ-L-リジン、酵素としてペルオキシダーゼ、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質として抗体断片である $F(ab')_2$ を用いた場合の酵素-タンパク質-担体複合体の製造について、以下に概説する。

【 0 0 3 2 】

① チオール基結合担体の作成

ポリ-L-リジン含有溶液にS-アセチルメルカプトスクシニクアンハイドライドを加え反応させた後、ヒドロキシルアミンを反応させ、担体にチオール基を導入する（担体-SHの作成）。但し、担体はすべてチオール化するのではなく、いくつかのアミノ基は遊離のまま残しておく。

【 0 0 3 3 】

② マレイミド基結合ペルオキシダーゼの作成

西洋ワサビペルオキシダーゼ（POD）にEMCSを反応させ、マレイミド基結合ペルオキシダーゼ（M-POD）を作成する。

【 0 0 3 4 】

③ POD-ポリ-L-リジン複合体 1 の作成

チオール基結合担体とM-PODとを混合、反応させることにより、複合体（担体-S-M-POD）を作成する。反応後、メルカプトエタノールにより残存するマレイミド基をブロックする。この反応により、上記したS-M-POD及びSH基が導入される他、遊離のアミノ基も有する担体（複合体）が得られる。

【 0 0 3 5 】

④ マレイミド基結合前記複合体の作成

前記複合体に大過剰のEMCS溶液を加えて反応させ、前記複合体のすべてのアミノ基にマレイミド基を導入する。この反応により、S-M-POD、マレイミド基、SH基とEMCSが結合した後EMCSのN-ヒドロキシスクシニクアンハイドライドが加水分解して生じるCOOH基、が導入された担体（複合体）が得られる。

## 【0036】

## ⑤ チオール基結合ペルオキシダーゼの作成

PODにS-アセチルチオグリコリックアシド-N-ヒドロキシスクシニックアンハイドライドを反応させた後、ヒドロキシルアミンを反応させ、PODにチオール基を導入する。その際、PODに遊離のアミノ基が残るような条件で反応させる ( $\text{SH-POD-NH}_2$ )。

## 【0037】

## ⑥ POD-ポリ-L-リジン複合体2の作成

$\text{SH-POD-NH}_2$ と④で得た複合体を反応させることにより、担体に結合したマレイミド基にチオール化したペルオキシダーゼを導入する。その後、残存したマレイミド基をメルカプトエタノールで処理し、OH基に転換する。この反応により、 $\text{S-M-POD}$ 、 $\text{M-S-POD-NH}_2$ 、COOH基、OH基が導入された、担体（酵素複合体）が得られる。

## 【0038】

## ⑦ マレイミド基結合PODを有するPOD-ポリ-L-リジン複合体2の作成

上記酵素複合体にEMCS溶液を反応させ、複合体のPODのアミノ基をマレイミド化する。 $\text{S-M-POD}$ 、 $\text{M-S-POD-M}$ 、COOH基、OH基を有する複合体が形成される。

## 【0039】

## ⑧ 還元した抗体断片の作成

ヤギ抗マウスIgGをペプシン処理してその $\text{F(ab')}_2$ 断片を得、これにシステアミン塩酸塩を反応させて還元した抗体断片 ( $\text{SH-Fab'}$ ) を得る。

## 【0040】

## ⑨ 酵素抗体複合体の作成

還元した抗体断片と⑦で得た複合体を混合させることにより、PODのマレイミド基に抗体断片が結合する。この反応により、 $\text{S-M-POD}$ 、 $\text{M-S-POD-M-S-Fab'}$ 、 $\text{M-S-POD-M}$ 、COOH基、OH基が結合した担体（酵素抗体複合体）が得られる。必要あれば、更にメルカプトエタノールで処

理して、S-P-O-D-Mの未反応のマレイミド基をOH基に転換して、マレイミド基をブロックしてもよい。

【0041】

本発明に係わる酵素タンパク質複合体は、上記した構造を採ることに初めて成功したものであり、担体上の酵素が極めて多いためこれを発色させた場合、強い発色を得られる。また担体上は多数の酵素で占有されているにもかかわらず、他の物質に特異的に結合性を示すタンパク質が酵素上に結合することができるため、結果として多数の他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質を複合体に結合させることができ、従って他の物質との結合の確率は極めて高くなる。

【0042】

したがって本発明に係る酵素-タンパク質複合体によれば、他の物質に特異的な結合性を示すタンパク質が多数存在するため、微量にしか存在しない測定対象物質であってもこれを捕捉、結合することができる。そして該タンパク質のどれかひとつに測定対象物質が結合した場合、この酵素-タンパク質複合体には多数の酵素が結合しているため、非常に強い発色を得られる。すなわち本発明によれば、極く微量の物質であっても、これを高感度で検出、測定することができ、正確な測定が可能となる。したがって、本複合体を使用することにより、すぐれた測定キットを組むことができる。

【0043】

また、本発明においては、酵素-タンパク質複合体を創製するに際して、既述したように、ポリリジンを最初からEMCSで処理するのではなく（沈殿が生じて使用できなくなる）、最初にS-アセチルメルカプトエチルサクシニックアンハイドライドで処理して担体のアミノ基の一部をメルカプト化し、これにマレイミド化した酵素を結合せしめた後、大過剰のEMCSで処理することによりマレイミド化及びカルボキシル化し、次いでチオール基結合酵素を反応させれば、最初の酵素の結合数は少数であっても、最終的には多数の酵素を結合させることがはじめて可能となり、しかも、沈殿や沈降することなく、溶液状態で多数の酵素を結合させることができるという著効が奏される。

【0044】

よって、本発明によれば、ごく微量の試料、非常に希釈された試料であっても、正確にその物質を分析することができるという著効が奏される。

【0045】

【実施例】

以下に本発明を更に詳細に説明するために実施例を記載するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0046】

【実施例 1】

酵素担体複合体の製造

マレイミド基結合ペルオキシダーゼを次のように調製した。2.4 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 100 mg の西洋ワサビペルオキシダーゼに 0.6 ml のジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した 20 mg の EMCS を加え、室温で 30 分反応させた。その後、セファデックス G 25 (ファルマシア製) にてゲルろ過を行い 403 nm の吸光度を測定し、そのピークを集め限外濾過にて濃縮した。

【0047】

次に、チオール基結合ポリリジンを以下の通り調製した。1 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶解した 5 mg のポリ-L-リジンヒドロブロマイド (シグマ社製、分子量 37600) に 20  $\mu$ l の DMF に溶解した 6 mg の S-アセチルメルカプトスクシニクアンハイドライドを加え、30℃、20 分間反応させた。その後、100  $\mu$ l の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7)、10  $\mu$ l の EDTA (pH 7)、100  $\mu$ l の 1 M ハイドロキシルアミン (pH 7) を加え、30℃、5 分間反応させた。次に反応液をセファデックス G 25 にてゲルろ過し、230 nm の吸光度のピークを集め、限外ろ過にて濃縮した。この場合、全アミノ基をチオール化するものではない。

【0048】

マレイミド基結合ペルオキシダーゼとチオール基結合ポリ-L-リジンを混合し 4℃、18 時間反応させた。0.1 M メルカプトエタノールを 10 分の 1 容加えて 30℃、20 分間反応させた後、ウルトロゲル ACA 44 (バイオセプラ社



製) にてゲルろ過し、各分画の 403 nm の吸光度を測定した。西洋ワサビペルオキシダーゼとポリ-L-リジンの複合体は高分子画分に存在した。この画分を限外ろ過にて緩衝液を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に交換した後、3 ml まで濃縮した。複合体の西洋ワサビペルオキシダーゼの量は 20 mg であった。これを酵素担体複合体 1 とした。

## 【0049】

上記複合体に 0.75 ml の DMF に溶解した 50 mg の EMCS を加え、室温で 30 分間反応させた。生成物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、403 nm の吸光度のピークを集め限外ろ過にて濃縮した。これをマレイミド基結合酵素担体複合体 1 とした。この場合、全アミノ基はマレイミド化し、チオール基はカルボキシル基に転換される。

## 【0050】

次に、チオール基結合西洋ワサビペルオキシダーゼを以下のように調製した。

2.5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 100 mg の西洋ワサビペルオキシダーゼに 0.5 ml の DMF に溶解した 2.5 mg の S-アセチルメルカプトチオグリコリックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (SATA) を加え、室温で 30 分間反応させた。その後、100  $\mu$ l の EDTA (pH 7)、0.5 ml の 1 M ヒドロキシルアミン (pH 7) を加え室温で 5 分間反応させた。反応物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、403 nm の吸光度を持つ画分を濃縮した。チオール基結合西洋ワサビペルオキシダーゼのチオール基をジャーナル オブ イムノアッセイ (Journal of Immunoassay), 4(3) p209~327 に記載された公知の方法で測定した。その結果、1 分子の西洋ワサビペルオキシダーゼに存在するチオール基は 1.3 と計算された。西洋ワサビペルオキシダーゼには 3 以上のアミノ基が存在する。従って、上記条件で調製されたチオール基結合西洋ワサビペルオキシダーゼには少なくとも 1 以上のアミノ基が残存することが確認された。

## 【0051】

マレイミド基結合酵素担体複合体とチオール基結合西洋ワサビペルオキシダーゼを混合し、4℃、18 時間反応させた。生成物に 0.1 M メルカプトエタノー

ルを 10 分の 1 容加え、30℃、20 分反応させた後、ウルトロゲル A c A 4 4 でゲルろ過し、403 nm の吸光度を測定した。複合体は高分子画分に溶出された。これを酵素担体複合体 2 とした。

#### 【0052】

また、マレイミド基結合酵素担体複合体とチオール基結合西洋ワサビペルオキシダーゼを混合し、4℃、18 時間反応させたのち、0.1 M システアミン塩酸塩を 10 分の 1 容加え、上記と同様に精製して得られた複合体を酵素担体複合体 3 とした。酵素担体複合体 2 及び酵素担体複合体 3 に結合した西洋ワサビペルオキシダーゼの量はいずれも 40 mg であった。

#### 【0053】

#### 【実施例 2】

##### 酵素第二抗体複合体の製造 1

ヤギ抗マウス Ig G は、公知の方法により、その F(ab')<sub>2</sub> 断片を調製した。ヤギ抗マウス Ig G Fab' は以下の方法で得た。0.5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) に溶解した 5 mg のヤギ抗マウス Ig G F(ab')<sub>2</sub> に 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) に溶解した 0.1 M システアミン塩酸塩を 55 μl 加え 37℃、1.5 時間反応させた。反応物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、280 nm の吸光度のピークを集め限外ろ過にて濃縮した。

#### 【0054】

マレイミド基結合酵素担体複合体 2 の調製は以下の通り行った。1.5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 5 mg の酵素担体複合体 2 に 375 μl の DMF に溶解した 10 mg の EMCS を加え、室温で 30 分反応させた。反応物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、403 nm の吸光度のピークを集め限外ろ過にて濃縮した。

#### 【0055】

マレイミド基結合酵素担体複合体 2 とヤギ抗マウス Ig G Fab' を混合し、4℃、18 時間反応させた。反応後、0.1 M メルカプトエタノールを反応液の 10 分の 1 容加え、30℃、20 分反応させた後、ウルトロゲル A c A 4 4 にてゲル

ろ過した。280 nm、403 nmの吸光度を測定し両方のピークを有する高分子画分が酵素-Fab'-担体複合体であった。

【0056】

【実施例 3】

酵素第二抗体複合体の製造 2

マレイミド基結合酵素担体複合体 3 の調製は以下の通り行った。1. 5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 5 mg の酵素担体複合体 3 に 375  $\mu$ l の DMF に溶解した 10 mg の EMCS を加え、室温で 30 分反応させた。反応物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、403 nm の吸光度のピークを集め限外ろ過にて濃縮した。

【0057】

上記と同様の方法で調製したヤギ抗マウス IgG Fab' とマレイミド基結合酵素担体複合体 3 を混合し、4℃、18 時間反応させた。反応後、0.1 M メルカプトエタノールを反応液の 10 分の 1 容加え、30℃、20 分反応させた後、ウルトロゲル AcA 44 にてゲルろ過した。280 nm、403 nm の吸光度を測定し両方のピークを有する高分子画分が酵素-Fab'-担体複合体であった。

【0058】

【実施例 4】

酵素第一抗体複合体の製造 1

ウサギ抗 p 53 遺伝子産物抗体 (ニチレイ製) を公知の方法に従って、ペプシン消化し、ウサギ抗 p 53 遺伝子産物 F(ab')<sub>2</sub> 断片を調製した。ウサギ抗 p 53 遺伝子産物 Fab' は以下の方法で得た。0.5 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) に溶解した 5 mg のウサギ抗 p 53 遺伝子産物 F(ab')<sub>2</sub> に 5 mM

EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) に溶解した 0.1 M システアミン塩酸塩を 55  $\mu$ l 加え 37℃、1.5 時間反応させた。反応物はセファデックス G 25 にてゲルろ過し、280 nm の吸光度のピークを集め限外ろ過にて濃縮した。このようにして得た、ウサギ抗 p 53 遺伝子産物 Fab' と実施例 3 と同様の方法で得たマレイミド基結合酵素担体複合体 3 を混合し、4℃、18 時間反応させた。反応後、0.1 M メルカプトエタノールを反応液の 10 分の

1 容加え、30℃、20分反応させた後、ウルトロゲルAcA44にてゲルろ過した。280nm、403nmの吸光度を測定し両方のピークを有する高分子画分が酵素-Fab'-担体複合体であった。

【0059】

【実施例5】

酵素第一抗体複合体の製造2

チオール基結合抗CD34モノクローナル抗体（ニチレイ製）の調製を次のように行った。1mlのPBSに溶解した5mgの抗CD34モノクローナル抗体に50μlのDMFに溶解した0.1mgのSATAを加え、室温で30分間反応させた。その後、10μlの0.1M EDTA（pH7）、100μlの1Mヒドロキシルアミン（pH7）を加え、室温で5分間反応させた。生成物はセファデックスG25によりゲルろ過にて精製した。このようにして得たチオール基結合抗CD34モノクローナル抗体と、実施例3と同様の方法で得たマレイミド基結合酵素担体複合体3を混合し、4℃、18時間反応させた。反応後、0.1Mメルカプトエタノールを反応液の10分の1容加え、30℃、20分反応させた後、ウルトロゲルAcA44にてゲルろ過した。280nm、403nmの吸光度を測定し両方のピークを有する高分子画分が酵素-モノクローナル抗体-担体複合体であった。

【0060】

【実施例6】

酵素ストレプトアビジン複合体の製造

チオール基結合ストレプトアビジンの調製を次のように行った。2.5mlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）に溶解した25mgのストレプトアビジンに250μlのDMFに溶解した0.25mgのSATAを加え、室温で30分間反応させた。その後、50μlの0.1M EDTA（pH7）、200μlの1Mヒドロキシルアミン（pH7）を加え、室温で5分間反応させた。生成物はセファデックスG25によるゲルろ過にて精製した。このようにして得られたチオール基結合ストレプトアビジンと、実施例3と同様の方法で得たマレイミド基結合酵素担体複合体3を混合し、4℃、18時間反応させた。反応

後、0.1 Mメルカプトエタノールを反応液の10分の1容加え、30℃、20分反応させた後、ウルトロゲルAcA44にてゲルろ過した。280 nm、403 nmの吸光度を測定し両方のピークを有する高分子画分が酵素-ストレプトアビジン-担体複合体であった。

【0061】

#### 【実施例7】

免疫組織化学における実施例3で調製した酵素抗体複合体と従来法で調製した酵素標識抗体の比較及びSAB法との比較

第一抗体として抗LCAモノクローナル抗体（ニチレイ製）を用い、腸の組織切片の染色を行った。まず、パラフィン包埋された組織を薄切しスライドグラスに付着させた。その後、脱パラフィン処理及び脱ペルオキシダーゼ処理を行い上記第一抗体と室温で1時間反応させた。PBSでよくすすいだ後、第二抗体を滴下した。第二抗体は実施例3で作製したものを6  $\mu$ g/mlの濃度で用いた。また、従来法でペルオキシダーゼを直接抗体に標識したのも同濃度で使用した。従来法の標識方法はジャーナル オブ イムノアッセイ (Journal of Immunoassay), 4(3) p209~327の方法に従い、用いた原料及び試薬はすべて実施例3と同様のものを用いた。これらの第二抗体とは室温で30分間反応させた。

【0062】

SAB法においては、第二抗体としてビオチン標識抗マウスポリクローナル抗体（ニチレイ製）を使用した。その場合、第二抗体と10分間反応させた後、洗浄しペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ニチレイ製）を滴下、5分間反応させた。その後、いずれの場合もよく洗浄し、基質溶液（ジアミノベンジン、過酸化水素）を滴下反応させ精製水で洗浄、封入を行い顕微鏡にて検鏡した。その結果を下記表1に示した。実施例3で作製した酵素第二抗体複合体は従来法で調製した酵素標識抗体と比較して、著しく優れていた。また、増幅操作を行うSAB法よりも優れていた。

【0063】

（表1）

標 品	染色強度
A	±
B	+++
C	+

A : 従来法の酵素標識抗体 B : 実施例 3 の酵素第二抗体複合体 C : S A B 法  
【 0 0 6 4 】

【実施例 8】

免疫組織化学における実施例 4 で調製した酵素第一抗体複合体と S A B 法の比較

S A B 法の第一抗体は実施例 4 の原料であるウサギ抗 p 5 3 ポリクローナル抗体（ニチレイ製）を用いた。まず、パラフィン包埋した胃癌の組織を薄切しスライドグラスに付着させた。その後、脱パラフィン処理及び脱ペルオキシダーゼ処理を行い上記第一抗体と室温で 1 時間反応させた。P B S でよくすすいだ後、ビオチン標識抗ウサギポリクローナル抗体（ニチレイ製）と室温で 1 0 分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを滴下、5 分間反応させた。

【 0 0 6 5 】

一方、実施例 4 で作製した酵素第一抗体複合体は脱ペルオキシダーゼ処理した後、室温で 1 時間反応させた。その際の酵素抗体複合体の濃度は  $2 \mu g / ml$  であった。その後、いずれの場合もよく洗浄し、基質溶液（ジアミノベンジジン、過酸化水素）を滴下し発色させ精製水で洗浄、封入を行い顕微鏡にて検鏡した。

結果は、酵素第一抗体複合体を用いた場合、増幅操作を行う S A B 法と同等の染色強度が得られた。

【 0 0 6 6 】

【実施例 9】

エンザイムイムノアッセイにおける実施例 3 で調製した酵素第二抗体複合体と従来法で調製した酵素標識抗体の比較

9 6 穴マイクロタイタープレートにヤギ抗マウス I g G を  $1 0 \mu g / ml$  の濃度で  $1 0 0 \mu l$  加え、室温で 2 時間インキュベートした。生理食塩水で洗浄後、

1%ウシ血清アルブミンを200 $\mu$ l加え2時間インキュベートした。所定の濃度(0~1000pg/ml)のマウスIgGを100 $\mu$ l加え2時間インキュベートし、生理食塩水で洗浄後、実施例3で調製した酵素第二抗体複合体を抗体量換算で0.5 $\mu$ g/mlで、従来法で調製した酵素標識抗体を抗体量換算で2 $\mu$ g/mlの濃度で100 $\mu$ l加え30分インキュベートした。さらに生理食塩水で洗浄し、基質溶液(テトラメチルベンジジン、過酸化水素)を100 $\mu$ l加え15分間反応させ、1N硫酸50 $\mu$ l加えて反応を停止した。呈色の程度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果は図1の通りで実施例3で調製した酵素第二抗体複合体が従来法で調製した酵素標識抗体と比較して、より少ない抗体量で強い発色を得られた。

## 【0067】

図1は上記の結果を示すものである。図中、横軸はマウスIgGの濃度、縦軸は450nmの吸光度を示すものである。●は実施例3で作製した酵素抗体複合体、○は従来法で作製した酵素標識抗体である。

## 【0068】

## 【発明の効果】

本発明の酵素-タンパク質複合体は、特に免疫組織化学、エンザイムイムノアッセイにおける酵素標識抗体(第一抗体はもとより第二抗体としても)として有用であり、感度の高い免疫測定を可能にするものである。

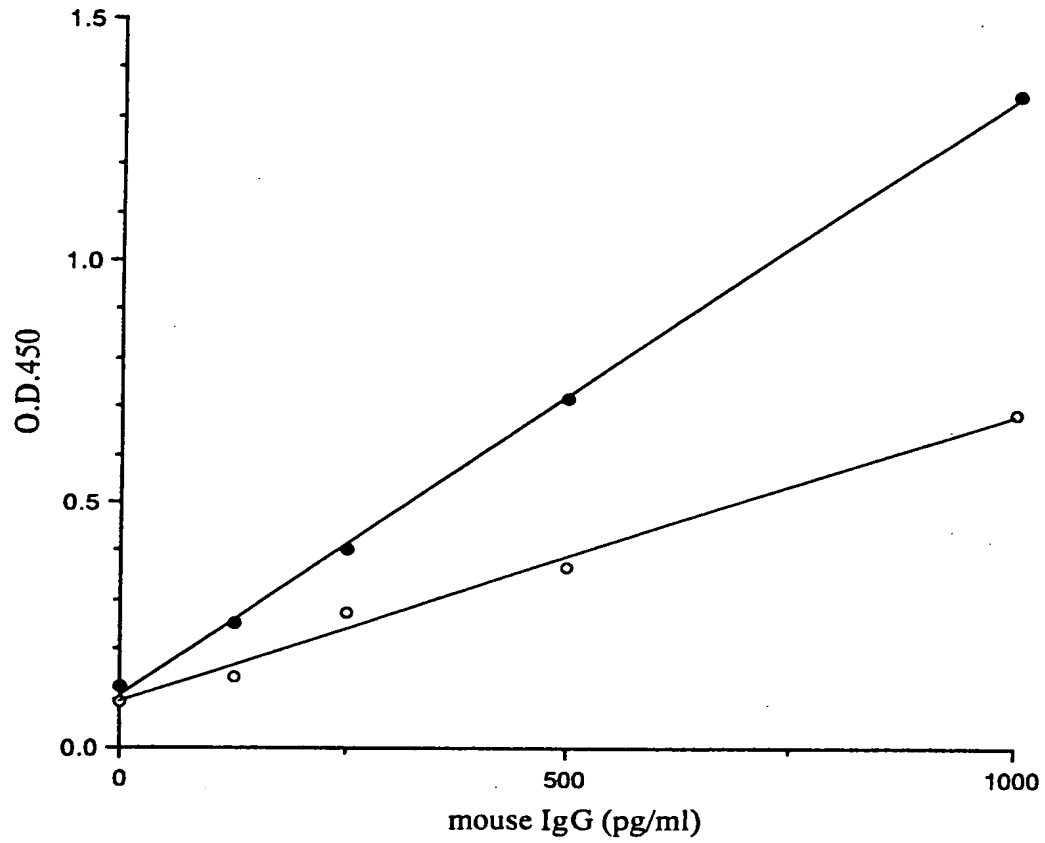
## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

本発明の実施例9の結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】





【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ポリリジン等の担体にアミノ基等を介して2個以上の酵素が結合し、その酵素の少なくとも1個以上に測定しようとする他の物質（例えば抗原）に特異的な結合性を示すタンパク質（例えば抗体）が結合したこと、を特徴とする酵素－タンパク質複合体。

【効果】 本複合体によれば、極く少量の物質であっても、これを高感度で正確に測定することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第365554号
受付番号	59901256540
書類名	特許願
担当官	喜多川 哲次 1804
作成日	平成12年 1月 4日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000134970
【住所又は居所】	東京都中央区築地6丁目19番20号
【氏名又は名称】	株式会社ニチレイ

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100075775
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目19番14号 邦楽ビル 503
【氏名又は名称】	戸田 親男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000134970]

1. 変更年月日 1991年 5月31日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都中央区築地6丁目19番20号  
氏 名 株式会社ニチレイ